

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/03771

10/509120

27.03.03

28 SEP 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月29日

出願番号

Application Number:

特願2002-097121

[ST.10/C]:

[JP2002-097121]

REC'D 23 MAY 2003

WIPO PCT

出願人

Applicant(s):

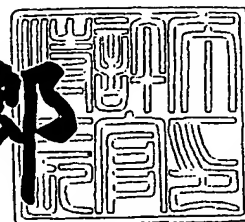
旭化成株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033447

【書類名】 特許願

【整理番号】 X14-288

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/32

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県田方郡大仁町三福 6 3 2 番地の 1 旭化成株式会
社内

 【氏名】 山越 勝

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県田方郡大仁町三福 6 3 2 番地の 1 旭化成株式会
社内

 【氏名】 高妻 卓司

【特許出願人】

 【識別番号】 000000033

 【氏名又は名称】 旭化成株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100090941

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 藤野 清也

【選任した代理人】

 【識別番号】 100113837

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 吉見 京子

【選任した代理人】

 【識別番号】 100076244

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 藤野 清規

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 014834

【納付金額】

21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】

明細書 1

【物件名】

図面 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】明細書

【発明の名称】軽症耐糖能異常および／またはインスリン初期分泌不良の検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中に含有されるミオイノシトールを定量し、特徴的な値以上を軽症耐糖能異常もしくは耐糖能異常であると判定することを特徴とする軽症耐糖能異常もしくは耐糖能異常の検査方法。

【請求項 2】 試料中に含有されるミオイノシトールを定量し、特徴的な値以上をインスリン初期分泌不良もしくはインスリン分泌不全であると判定することを特徴とするインスリン初期分泌不良もしくはインスリン分泌不全の検査方法。

【請求項 3】 試料中のミオイノシトールを定量する方法が酵素を用いる方法である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 酵素がミオイノシトールデヒドロゲナーゼである請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 酵素を用いてミオイノシトールを定量する方法が酵素サイクリング法である請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】 試料中のミオイノシトール以外の糖を消去した後に、ミオイノシトールを定量することを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 2 種類のヘキソキナーゼを同時に反応させて、ミオイノシトール以外の糖を消去することを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 2 種類のヘキソキナーゼが ATP-ヘキソキナーゼと ADP-ヘキソキナーゼであることを特徴とする請求項 7 に記載の定量方法。

【請求項 9】 ミオイノシトール定量反応に用いる補酵素であるチオ NAD の濃度が終濃度で 0.1 mM 以上であることを特徴とする請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の定量方法。

【請求項 10】 ミオイノシトール定量反応に用いる補酵素であるチオ NAD の濃度が終濃度で 2 ～ 10 mM であることを特徴とする請求項 5 ～ 8 のいずれかに記載の定量方法。

【請求項 11】 試料が糖負荷前と糖負荷後、もしくは食事前と食事後に得られ

た試料である請求項1～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 試料が尿である請求項11に記載の方法。

【請求項13】 試料が尿であり、かつ特徴的な値が、75gグルコース負荷後に尿中に排泄されるミオイノシトールの増加量として $0 \sim 20 \mu\text{g} / \text{mg} \cdot \text{クレアチニン}$ であることを特徴とする請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項14】 試料が尿であり、かつ特徴的な値が、75gグルコース負荷後に尿中に排泄されるミオイノシトールの増加量として $8 \sim 12 \mu\text{g} / \text{mg} \cdot \text{クレアチニン}$ であることを特徴とする請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項15】 試料中のミオイノシトールと併せて試料中のグルコースを定量することを特徴とする請求項1～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】 ミオイノシトール定量用組成物であって、少なくとも以下の成分を含むことを特徴とする組成物。

- 1) チオNAD
- 2) NADH
- 3) ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ
- 4) ヘキソキナーゼ

【請求項17】 ヘキソキナーゼがATP-ヘキソキナーゼとADP-ヘキソキナーゼであることを特徴とする請求項16に記載の定量用組成物。

【請求項18】 緩衝液を含み、緩衝液としてBicine (N,N-Bis(hydroxyethyl)glycine)、Tris ((Tris(hydroxymethyl)aminomethane)、TEA (Triethanolamine)、Tricine (N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycine)を用いることを特徴とする請求項16または17に記載の定量用組成物。

【請求項19】 チオNADの濃度が終濃度で 0.1 mM 以上であることを特徴とする請求項16～18のいずれかに記載の定量用組成物。

【請求項20】 チオNADの濃度が終濃度で $2 \sim 10 \text{ mM}$ であることを特徴とする請求項16～19のいずれかに記載の定量用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は軽症耐糖能異常、もしくはインスリン初期分泌不良などの検査方法に関するものである。また本発明は、これら軽症耐糖能異常、もしくはインスリン初期分泌不良を経て発症する疾患、例えば糖尿病、動脈硬化、高血圧などの疾患の予知、診断方法、さらにそれら疾患の予防、治療・指導の効果判定方法、もしくは治療するための薬剤評価方法に応用することができる。

【0002】

【従来の技術】

糖尿病治療の最終的な目標は、糖尿病合併症の発症予防ならびに進展抑制であるが、この目標を達成するためには、できるだけ初期の段階で異常を見つけだし治療することが重要であるということが、臨床試験によって実証されている [Diabetes Research and Clinical Practice, 28, 103 (1995)など]。

さらに、糖尿病を発症する以前、つまり、糖尿病予備群、さらに現在は糖尿病予備群ではないが近い将来糖尿病もしくは予備群に移行する確率の高い軽症耐糖能異常やインスリン初期分泌不良を見つけだし、治療または運動や食事の指導を行なうことも、さらに進んだ予防的治療法として効果があると考えられ、このことを科学的に実証するための臨床試験が進められている [Diabetes Care, 21, 1720 (1998)など]。したがって、糖尿病予備群の検出は糖尿病、さらには糖尿病合併症の予防を行う上で重要である。さらに現在は糖尿病予備群ではないが近い将来糖尿病もしくは予備群に移行する確率の高い軽症耐糖能異常やインスリン初期分泌不良を診断することが、より早期に糖尿病の予防を行うとの観点から最も重要と考えられている。

【0003】

糖尿病を診断する方法には、例えば経口糖負荷試験があり、75g経口グルコース負荷試験を行った場合に、空腹時血糖110mg/dl未満かつ負荷後2時間血糖140mg/dl未満である群を正常型と判定する。また空腹時血糖110mg/dl以上126mg/dl未満かつ負荷後2時間血糖140mg/dl未満である群を空腹時血糖異常上昇(impaired fasting glysemia, IFG)、空腹時血糖126mg/dl未満かつ負荷後2時間血糖140mg/dl以上200mg/dl未満である群を耐糖能異常(impaired glucose tolerance, IGT)と

し、IFG+IGT=境界型と判定する。空腹時血糖126mg/dl以上または負荷後2時間血糖200mg/dl以上である群を糖尿病型と判定する。

また日本糖尿病学会の指針には、空腹時血糖値、負荷後2時間血糖値だけを用いた判定では正常型であっても、糖負荷後1時間時の血糖値が180mg/dl以上である場合は糖尿病型に移行する率が高いので境界型に準じた扱いとするとある。

【0004】

耐糖能不良もしくは耐糖能不全とは、食事などによって血中に糖が流入した際に、血中の糖を骨格筋、肝臓、脂肪細胞などの末梢組織に充分取り込むことができずに血糖値が上昇する状態をいい、上昇する程度が健常者と比較すると高いが軽度である場合を軽症耐糖能異常という。

【0005】

インスリンは、膵臓の β 細胞から分泌されるホルモンであり、骨格筋、肝臓、脂肪組織に作用して、血糖を下げる作用を有する。インスリン初期分泌不良もしくはインスリン分泌不全は食事などによって血中に糖が流入した際に、血中の糖を骨格筋、肝臓、脂肪細胞などの末梢組織に充分取り込むために充分なインスリンが分泌されない状態をいい、インスリン初期分泌不良とは、日本糖尿病学会の指針によればインスリノジェニック・インデックス（血糖値の糖負荷後30分値と糖負荷前値の差 $[\Delta PG(30-0)]$ に対する血中インスリン値の糖負荷後30分値と糖負荷前値の差 $[\Delta IRI(30-0)]$ 、すなわち、 $\Delta IRI(30-0)/\Delta PG(30-0)$ ）が0.4未満の状態をいう。

【0006】

しかしこれらの診断のための血糖値やインスリンの測定のためには、いずれの場合も短時間に複数回の採血が必要な侵襲的な方法であり、被験者に多大な苦痛を与える。従ってこれらの欠点を解消する簡便なより侵襲性の少ない検査方法、好ましくは非侵襲的な検査方法が望まれている。

一方、生体試料中のミオイノシトールを定量することは、糖尿病の診断に有用であると考えられており、以下のような例が報告されている。

(a) 尿中ミオイノシトール濃度は糖尿病で増加する [Larner J. et al., New Eng. J. Med., 323, 373-378(1990)]。

(b) 尿中ミオイノシトール量は正常型、境界型において差がない。[Susumu Suzuki, Diabetes Care, Vol.17, No12(1994)1465-1468]。

(c) 糖負荷後の尿中ミオイノシトールが正常型に比べて境界型 (I F G、I G T)、糖尿病型で増加している (特開2001-190299号)。

【0007】

上記 (a)、(b) は尿中のミオイノシトールをGC/MS法によって測定した結果であるが、測定者により結果が異なっているためデータの再現性、信頼性に問題がある。また一方 (c) では酵素を用いた高感度なミオイノシトール測定試薬により尿中のミオイノシトールを測定した結果であり、GC/MS法と比べより正確で信頼のある結果が得られた。これにより糖尿病予備群の検出が可能となった。

しかしこのミオイノシトール測定試薬は、①測定範囲が狭く、尿中の様々な濃度のミオイノシトールを測定するには試料を希釈しなければならず、よって最小検出感度が充分でなかったこと、②尿中の共存物質、特にグルコースの影響回避が充分でないなどの課題が残されており、正常型に含まれている軽症耐糖能異常やインスリン初期分泌不良の検出は不可能であった。

【0008】

さらに、75g経口糖負荷前および糖負荷後2時間時の血糖値だけを用いて正常型と判定された場合には、0～2時間までの血糖推移の状態は反映されておらず、例えば実は糖負荷直後から血糖推移が高く維持されている近い将来糖尿病もしくは予備群に移行する確率の高い群 (軽症耐糖能異常やインスリン初期分泌不良) でも正常型に分類されてしまう。ここで軽症耐糖能異常とは正常型に分類されるが、空腹時、負荷後30分、1時間、2時間に採血を4回実施する負荷試験を行うと、①負荷後30分、1時間の血糖値が非常に高い (180mg/dL以上) 急峻高血糖や、②負荷後2時間時の血糖が140mg/dL未満ではあるが健常者より高い (例えば120mg/dL以上)、③ΣP Gが高い (例えば530mg/dL以上) などの特徴を有する、軽度に耐糖能が低下したものを指す。そのため上記 (a)～(c) の公知の事実からは、ミオイノシトールを調べることにより健常者と非健常者 (近い将来糖尿病もしくは予備群に移行する確率の高い群、例えば、軽症耐糖能異常、あるいは境界型、I F G、I G T、糖尿病型) の判別が可能であるとは予測でき

ない。

このように、従来技術では、糖負荷直後から血糖推移が高く維持されている近い将来糖尿病もしくは予備群に移行する確率の高い軽症耐糖能異常やインスリン初期分泌不良を検出する方法は見出されていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、軽症耐糖能異常および／またはインスリン初期分泌不良を簡便かつ再現性良く判定する検査方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を達成するために、軽症耐糖能異常および／またはインスリン初期分泌不良を有効に判定する何らかのマーカースを探ることが有効であると考えた。そこで本発明者らは鋭意検討の結果、従来インスリン抵抗性や糖尿病予備群（境界型や糖尿病型）の検出に有用と考えられていたミオイノシトールが意外にも、軽症耐糖能異常、インスリン初期分泌不良を有効に判定するマーカースとしても有用であることを見出した。

【0011】

試料としては、人体から分離された血清または血漿、尿、あるいは、ホモジナイズした生体組織抽出物等が用いられるが、非侵襲で得られる尿が好ましい。

【0012】

本発明者らは、精度が高く、簡便かつ安価なミオイノシトールの定量方法を提供することを目的としてミオイノシトールの高感度定量法および定量用組成物（特公平6-61278号）の開発を行ってきた。この前処理不要な酵素法によって、初めてミオイノシトールについて信頼できるデータの取得が可能になった。本発明の軽症耐糖能異常および／またはインスリン初期分泌不良の検査方法は、このようなミオイノシトールの高感度定量法および定量用組成物の開発があって、初めて成功したものである。

【0013】

さらに、被験者に一定量の糖を投与した後、一定時間の間に被験者から非侵襲

的に採取した尿中のミオイノシトール濃度を上記のミオイノシトール測定試薬にて定量したところ、糖尿病予備群（境界型、I F G、I G T）、糖尿病型のみならず、正常型に分類されてはいるが実は軽症耐糖能異常であるものや、正常型に分類されてはいるが実はインスリンの初期分泌の低下した者においても、あらかじめ健常者にて設定した特徴的な値よりも高いことが明らかとなり、本測定試薬により、正常型と耐糖能異常の進んだ非正常型（境界型、I F G、I G T、糖尿病）の判別のみならず、正常型に分類されてはいるが実は軽症耐糖能異常である者や、正常型に分類されてはいるが実はインスリンの初期分泌の低下した者を健常者と簡便かつ再現性良く高率に判別できることを見出した。

【 0 0 1 4 】

また試料中のミオイノシトールは微量であり、用いるミオイノシトールデヒドロゲナーゼによってはグルコースにも弱い作用を示すことから、予めグルコースを消去する必要がある場合がある。グルコースを消去する方法としては、ミオイノシトールの極端な化学的安定性を利用する方法や、酵素を触媒としてグルコースを修飾する方法がある。化学的安定性を利用する方法としては、6N塩酸存在下に加熱し、ミオイノシトール以外の糖類を酸分解し分解生成物中に残存しているミオイノシトールを回収する方法や、水素化ホウ酸ナトリウムの様な還元剤で処理し、ミオイノシトール以外のグルコースなどのカルボニル基またはホルミル基を有する糖類を還元し、ミオイノシトール定量用酵素であるミオイノシトールデヒドロゲナーゼと反応し得ない化合物に修飾する方法などがある。酵素を触媒としてグルコースを修飾する方法としては、試料中のグルコースをグルコースオキシダーゼ (EC1,1,3,4) にてグルコン酸に変換する方法や、試料中のグルコースをヘキソキナーゼ (EC2,7,1,1) にてグルコース-6-リン酸に変換する方法などがある。これら酵素により修飾されて生じた化合物は、いずれもミオイノシトール定量用酵素であるミオイノシトールデヒドロゲナーゼが作用しない化合物である。本発明らは、このような方法によって、予めグルコースを消去することが、より好ましいことを見出した。

【 0 0 1 5 】

さらに、本発明者らは、糖消去反応に関して、A T P -ヘキソキナーゼおよび

ADP-ヘキソキナーゼの2種類のキナーゼを同時に用いた場合に試料中の糖の影響が小さくなり、より正確にミオイノシトールを測定できることを見出した。またチオNAD濃度を終濃度で0.1mM以上、好ましくは2~10mMにすることによりミオイノシトールの測定範囲を既法の10倍程度まで広げられることを見出し、より高感度な測定系を完成することができた。

【0016】

特徴的な値とは、正常型からさらに選別した健常者の尿中ミオイノシトールの平均値、標準偏差やROC (Response operating characteristic) 曲線をもとに設定した値であり、試料が尿である場合は糖負荷前および糖負荷一定時間後に尿中に排泄されるミオイノシトールの量の増加量として $0 \sim 20 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{クレアチニン}$ 、もしくは $5 \sim 15 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{クレアチニン}$ 、好ましくは $8 \sim 12 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{クレアチニン}$ である。また今後大規模試験を行って、臨床的に確定した健常者を判断したときにはこの特徴的な値は変わることもあり得る。また特徴的な値については、例えば人種、性別、年齢など母集団の選択によって変わることもあり得る。

【0017】

以下、本発明およびその好ましい形態について更に詳しく説明する。

本発明における軽症耐糖能異常、インスリン初期分泌不良の検出は、被験者への糖負荷前および糖負荷一定時間後に尿中に排泄されるミオイノシトールの量を本試薬にて測定し、前後のミオイノシトールの増加量、または増加率をあらかじめ健常者にて設定した特徴的な値と比較して行う。

増加量は糖負荷一定時間後のミオイノシトール量と糖負荷前のミオイノシトール量の差として算出され、増加率は糖負荷一定時間後のミオイノシトール量と糖負荷前のミオイノシトール量の比として算出される。

【0018】

ミオイノシトールの濃度は、実測値または飲水などによる尿の希釈の影響を補正するための適当な標準となる指標に対する相対値が使用されても構わない。指標としてはそれぞれの尿におけるクレアチニン値が好ましい。測定の対象は糖尿病などの生活習慣病の疑いがあるものだけではなく、全てのものが対象となりうる。

【0019】

糖負荷の量および糖負荷の方法は、いかなる量、いかなる方法でも構わないが、通常の糖負荷試験に用いられている75gグルコースの水溶液を経口投与する方法または食事が好ましい。

【0020】

尿を採取する時間は、糖負荷前および糖負荷直後から6時間後までのいずれの時期であっても構わず、30分から3時間までが好ましい。蓄尿期間は30分から3時間までの間で適宜選択される。

【0021】

試料として尿を用いる場合には非侵襲の方法であるので、サンプル採取の方法、時間、場所を選ばずに済む。例えば自宅、職場、学校などにおいて自分で簡単にサンプルを作ることができ、採取した尿を直接、または濾紙などにしみ込ませて輸送することも可能であるため、医療機関などで拘束される必要もない。尿を濾紙などにしみ込ませた場合には、送付されたサンプルを適当な方法で抽出し、本発明を用いて簡便、短時間に測定し、結果を被験者に直ちに返すことができる画期的な方法を提供できる。

特に糖負荷を行わず普段通りに生活しながら随時尿中のミオイノシトールをモニタリングし、例えば1日のなかの最高ミオイノシトール量、または最高ミオイノシトール量と最低ミオイノシトール量の差で耐糖能異常の程度、インスリン初期分泌不良の程度を把握することも可能である。また随時尿中のミオイノシトールをモニタリングすることで、食事内容の見直しや、運動量の調整を行い普段通りに生活しながら糖尿病の予防や進行防止をサポートすることも可能である。

【0022】

尿中ミオイノシトールをモニタリングする方法としては、ミオイノシトールが検出できればいかなる方法でも構わないが、例えばミオイノシトールに作用する酵素を試験紙に固定する試験紙法や、ミオイノシトールに作用する酵素を電極に固定化してセンサーとし電気化学的に検出する方法が挙げられる。

試験紙法では、例えばオキシダーゼにより生じた過酸化水素にペルオキシダーゼを作用させ活性酸素を発生せしめ、これが色原体を酸化し呈色される度合いを

観察すればよい。色原体としてはヨウ化カリウム、テトラメチルペンチジン、N-(3-スルホプロピル)-3,3',5,5'-テトラメチルペンチジンナトリウム、4-アミノアンチピリン、0-トリジンなどが挙げられるがこれに限定されるものではない。

またセンサーで検出する場合、例えばオキシダーゼを用いる場合には生じた過酸化水素を直接電極にて測定するか、もしくはフェロセン誘導体やキノン誘導体などの電子伝達体を介在させ、得られる酸化還元電流あるいはその電気量を測定すれば良く、デヒドロゲナーゼを用いる場合にも同様に、還元型補酵素を直接電極測定するか、電子伝達体を介在させ、得られる酸化還元電流あるいはその電気量を測定すれば良い。例えば「バイオセンサおよびそれを用いた基質の定量法（特願平9-263492）」などの例が挙げられる。

【0023】

また例えばトイレ便器などに直接、あるいは併設したデバイス内に上記センサーを組み込むことで、日常の尿中ミオイノシトールのモニタリングをより簡便にすることもできる。さらにデバイスに測定結果を記憶する機能、情報端末などへの接続機能を持たせることにより、例えば被験者が遠隔地に住むような場合でも、電子媒体を用いて医師や医療機関との連携のもとに生活データを管理・指導し、耐糖能異常の程度、インスリン初期分泌不良の程度を把握し、食事内容の見直しや、運動量の調整、生活習慣の改善、治療を行うことも可能である。

【0024】

また測定した結果に医師の診断を添付すればより精密な管理ができる。さらに従来のマーカーでは判別し得ない糖尿病を発症する以前、つまり、糖尿病予備群、さらに現在は糖尿病予備群ではないが近い将来糖尿病もしくは予備群に移行する確率の高い軽症耐糖能異常やインスリン初期分泌不良を見つけだすことで糖尿病に移行するリスクがわかるので、例えば生命保険等の審査項目として使用することもできる。

【0025】

試料中のミオイノシトールを定量するには、ミオイノシトール定量用組成物に試料1~500 μ L を加え、37℃の温度にて反応させ、反応開始後の一定時間後の2点間の数分ないし数十分間、例えば3分後と4分後の1分間、または3分と8分

後の 5 分間において変化した補酵素の量を直接または間接的に測定すれば良い。
この場合既知濃度のミオイノシトールを用いて測定した場合の吸光度等の変化と
比較すれば試料中のミオイノシトール量を求めることができる。

【 0 0 2 6 】

定量用組成物（試薬）は、少なくともミオイノシトールに作用する酵素を含む
ことが必要であるが、さらに、補酵素を含むものが好ましい。

また本試薬にはポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(OP-10)などの界
面活性剤を適宜添加しても構わない。

また本試薬は液状品、凍結乾燥品、凍結品の形で用いられる。

【 0 0 2 7 】

試料中のミオイノシトールを定量するには酵素を用いミオイノシトールを定量
できる方法であればいずれの方法を用いても良い。本発明に使用しうるミオイノ
シトールを定量できる酵素としては、少なくともミオイノシトールに作用する酵
素であればいかなる酵素を用いても良いが、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ
が好ましく、フラボバクテリウム・エスピー(Flavobacterium sp.)671(FERM BP-
7323、以下F.sp.671と略す)由来のミオイノシトールデヒドロゲナーゼが最も好
ましい。また用いるミオイノシトールデヒドロゲナーゼは試薬中に含まれるチオ
NADやNADHなどの補酵素に悪影響を与える、例えばNADHオキシダーゼのような補
酵素分解活性を持つ物質などのコンタミネーションをできる限り軽減、もしくは
なくしたものが好ましい。

なお、F.sp.671株は日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6所在の
独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに、受託番号FERM BP-73
23（受託日平成12年10月12日）として寄託されている。

【 0 0 2 8 】

検出方法としてはミオイノシトールが検出できればいかなる方法でも構わない
が、例えばチオNADを用いた黄色発色、NBT（ニトロブルーテトラゾリウム）を用
いた青色発色、あるいはINT(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-
-tetrazolium chloride)を用いた赤色発色に代表される可視光発色試薬を用いる
方法、発光法や蛍光法を用いる方法、電気的变化を捉える方法、およびこれらを

増幅する方法を組み合わせる方法が挙げられる。

また上記の方法を利用できるコンパクトなデバイスを用いることで時間や場所の制限を受けずに非侵襲的に尿中ミオイノシトールを測定することも可能である。

【0029】

ミオイノシトールデヒドロゲナーゼの活性測定法は以下のとおりである。

(1) 活性測定法

<反応液組成>

100mM トリス緩衝液 (pH8.5)

20mM ミオイノシトール (シグマ社製)

2mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) (オリエンタル酵母社製)

5U/ml ジアフォラーゼ (旭化成社製)

0.025 % ニトロブルーテトラゾリウム (NBT ; 和光純薬社製)

1.5 % トリトン (Triton) -X100 (和光純薬社製)

上記反応液1ml を小試験管に入れ、37℃で 5 分間インキュベート後に、B 倍に希釈した酵素液20μl を添加して攪拌し、反応を開始する。正確に5分間の反応後に0.1N HCl 2ml を添加して攪拌し反応を停止する。550nm における吸光度を測定し、A1を求め、また上記反応液よりミオイノシトールを除いた反応液を用いて同様の測定を行いその吸光度A0を求める。酵素活性は下記の式より算出する。

【0030】

【数1】

$$U/ml = \frac{(A1 - A0)}{18.3} \times \frac{1}{5} \times \frac{3.02}{0.02} \times B$$

式中の数値は、次の意味である。

18.3 ; NTB の分子吸光係数

5 ; 反応時間

3.02 ; 総反応液量

0.02 ; 酵素液量

B ; 酵素液の希釈倍率

F. sp.671株由来のミオイノシトールデヒドロゲナーゼの性状は以下の通りである。

【0031】

(2) 酵素作用

少なくともミオイノシトールおよび補酵素の存在下、イノソース及び還元型補酵素を生成する。上記の補酵素に関しては、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類（以下NAD 類と略する）、例えば、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチド（アセチルNAD）、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド（デアミノNAD）、ピリジンアルデヒドアデニンジヌクレオチド（アルデヒドNAD）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADP）、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（チオNAD）、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（チオNADP）が挙げられる。各補酵素を用いた場合の相対活性比（NAD を補酵素 として用いた場合を100%とする）は表1に示すとおりである。また相対活性は下記の方法に基づき補酵素を変えて測定を行った。

【0032】

相対活性測定法

<反応液組成>

緩衝液 100mM グリシン緩衝液（pH10.0）

基質 20mM ミオイノシトール（シグマ社製）

補酵素 2mM

（NAD、チオNAD、NADP、チオNADP；以上オリエンタル酵母社製）。

上記の反応液1ml を石英セルにとり、37℃ に温度コントロールされている分光光度計にセットする。5分以上インキュベートし、約1.0U/ml の酵素溶液を20 μ lを添加、攪拌する。それぞれの還元型補酵素に特有な波長の1分間当たりの吸光度変化より初速度を求める。各補酵素で求めた初速度を、NAD を補酵素 と

して用いた場合の初速度（100％）と対比して、相対活性とした。

【0033】

【表1】

各補酵素を用いた場合の相対活性比	
菌株名	F. sp. 671
補酵素	ミオイノシトール
NAD	100 %
NADP	8 %
チオNAD	29 %
チオNADP	0 %

【0034】

(3) 基質特異性

前記の相対活性測定法に従い、反応液中の基質に変えて同一濃度のD-カイロイノシトール、D-マンノース、D-フルクトース、D-ガラクトース、マンニトール、エピイノシトール、サイロイノシトールを測定した。ミオイノシトールに対する反応初速度を 100とした場合の各基質における酵素活性を表2 に示す。

F.sp.671株由来の酵素はミオイノシトールに特異性が高いデヒドロゲナーゼであることが明らかである。

基質としては、D-マンノース、D-フルクトース、D-ガラクトース、マンニトール、D-カイロイノシトール（以上、和光純薬社製）、ミオイノシトール、エピイノシトール、サイロイノシトール（以上、シグマ社製）を用いた。

【0035】

【表2】

基質特異性	
菌株名	F. sp. 671
補酵素	NAD
ミオイノシトール	100 %
カイロイノシトール	18 %
サイロイノシトール	1 %未満
エピイノシトール	2 %
ガラクトース	1 %未満
フルクトース	1 %未満
マンノース	1 %未満
マンニトール	0 %

【0036】

(4) 至適pH

前記の相対活性測定法を用い、反応液中の 100mM のpH10.0グリシン緩衝液にかえて 100mMトリス緩衝液(pH7.0~9.0)及び100mM グリシン緩衝液(pH9.0~11.0)の各緩衝液を用いて測定した。測定の結果、至適pHは、11.0付近(基質; ミオイノシトール)であることが分かった。

【0037】

(5) 分子量

TSK ゲルG300SW (0.75 ϕ \times 600mm)、溶離液; 50mMリン酸緩衝液 (pH7.5) + 0.2MNa₂SO₄ + 0.05%NaN₃、分子量マーカーはオリエンタル酵母社製(日本)を使用した。クロマトグラフィー装置は島津社製装置(日本)を使用し、UV280nm 及びフラクションの活性測定にて検出した。活性測定はミオイノシトールを基質として用いた。40000 \pm 10000であることが分かった。

【0038】

(6) 熱安定性

40℃、15分の処理でほぼ 100%の残存活性を有する。

酵素液、約5U/ml に15分間の加熱処理を行った。残存活性は前記の酵素活性測定法にて測定した。活性測定はミオイノシトールを基質として用いた。

【0039】

(7) Km値

前記の相対活性測定法を用い、ミオイノシトールの濃度及び、NAD 及びチオNAD の濃度を変化させそれぞれのKm値を測定した。なお、前記活性測定法を用いて基質濃度を変化させKm値を算出した。

基質に対するKm値

ミオイノシトール: 1.7 \pm 0.2mM

補酵素に対するKm値

NAD: 0.04 \pm 0.01mM

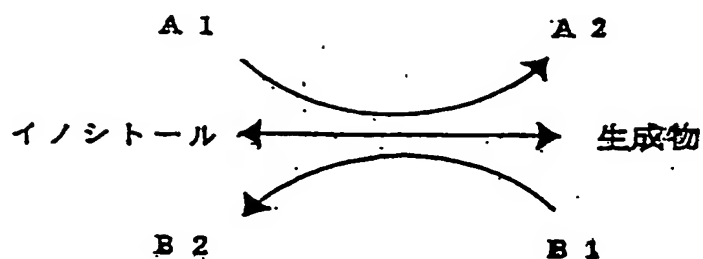
チオNAD: 4.5 \pm 1mM

【0040】

またミオイノシトールを定量するにあたり、さらに高感度が必要な場合には酵素

サイクリング法を用いることができる。下式にその1例を示す。

【化1】



【0041】

式中、A1はNAD(P)類、またはチオNAD(P)類を示し、A2は A1の還元型を示し、B1はA1がチオNAD(P)類の場合には還元型NAD(P)類を、A1がNAD(P)類の場合には還元型チオNAD(P)類を示し、B2はB1の酸化型生成物を示す。なお、ここで、NAD(P)は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸のことを表す。

【0042】

酵素サイクリングを用いたミオイノシトール定量反応の液組成については、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼの各種補酵素間の K_m 値等を考慮して補酵素を2種類またはそれ以上適宜選択し、その後正反応／逆反応の至適pHの間でpH条件を酵素的サイクリングが効率よく進行するように設定すればよい。A1、B1の量は試料中のミオイノシトール量に比較して過剰量であり、またミオイノシトールデヒドロゲナーゼのA1、B1に対する K_m 値に比較しても過剰量であることが必要である。

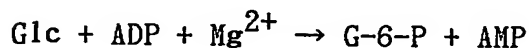
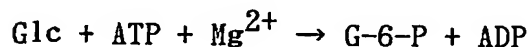
例えばF.sp.671由来のミオイノシトールデヒドロゲナーゼについてみれば、 K_m 値はNAD、チオNADについてそれぞれ0.04mM、4.5mMであり、サイクリング反応を行う場合にはチオNAD、NADHを補酵素として選択し、サイクリング反応を行うと良い。A1およびB1の濃度は0.02mM～2M、特に0.05～100mMが好ましく、ミオイノシトールデヒドロゲナーゼの量は1～1000U/mL、特に1～100U/mLが好ましいが、その量は被検体の種類や量および測定したい試料中のミオイノシトール量などにより適宜選択することができ、これ以外の量を用いることもできる。

【 0 0 4 3 】

試料中に存在する糖を消去する酵素としてヘキソキナーゼを用いる場合、グルコースからグルコース-6-リン酸への反応を触媒すればいかなるヘキソキナーゼを用いても良いが、例えば*Bacillus* sp.由来のヘキソキナーゼが挙げられる。好ましいヘキソキナーゼとしては熱安定性に優れたヘキソキナーゼが良い。熱安定性に優れたヘキソキナーゼは「安定なヘキソキナーゼおよびその製造法（特開2000-078982）」に記載の方法により取得することができる。

【 0 0 4 4 】

さらに本発明者らはグルコース-6-リン酸と同時に生成されるADPにより、本酵素サイクリング法は若干の反応阻害を受けるため、次式のようにADP依存性ヘキソキナーゼをヘキソキナーゼと同時に作用させることでミオイノシトールデヒドロゲナーゼの反応に影響を及ぼさずに、グルコース消去能を大幅に向上させることに成功した。



ATP：アデノシン5'-三リン酸、ADP：アデノシン5'-二リン酸、AMP：アデノシン5'-一リン酸

【 0 0 4 5 】

ヘキソキナーゼの活性測定法は以下の通りである。

＜反応液組成＞

50mM トリス緩衝液（pH8.5）（シグマ社製）

20mM グルコース（和光純薬社製）

4mM ATP（オリエンタル酵母社製）

5U/mL グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（東洋紡社製）

1mM NADP（オリエンタル酵母社製）

10mM 塩化マグネシウム（和光純薬社製）

酵素溶解希釈用液 50mM トリス緩衝液（pH8.5）

【 0 0 4 6 】

上記反応液1mLを光路長1cmのセルに入れ、37℃で5分間インキュベート後に、B

倍に希釈した酵素液20 μ Lを添加して攪拌し、反応を開始する。反応開始後、340nmにおける吸光度を測定して直線的に反応している1分間当たりの吸光度変化A1を求める。盲検は酵素液の代わりに酵素溶解希釈用液50 μ Lを加え同様の反応を行い1分間当たりの吸光度変化A0を求める。酵素活性は下記の式より算出する。

【0047】

【数2】

$$U/m l = \frac{(A1 - A0)}{6.22} \times \frac{1.02}{0.02} \times B$$

式中の数値は、次の意味である。

6.22 ; NADPHの340nmにおけるミリモル分子吸光係数

1.02 ; 反応総液量(mL)

0.02 ; 反応に供した酵素試料液量(mL)

B ; 酵素液の希釈倍率

【0048】

ADP依存性ヘキソキナーゼの活性測定法は以下のとおりである。

<反応液組成>

50mM トリス緩衝液 (pH7.5)

20mM グルコース溶液 (和光純薬工業社製)

2mM ADP溶液 (pH7.0) (オリエンタル酵母社製)

5U/mL グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (旭化成社製)

1mM NADP溶液 (オリエンタル酵母社製)

2mM 塩化マグネシウム溶液 (和光純薬工業社製)

酵素溶解希釈用液10mM トリス緩衝液 (pH7.5)

【0049】

上記反応液3mLを小試験管に入れ、37℃で5分間インキュベート後に、B倍に希釈した酵素液50 μ Lを添加して攪拌し、反応を開始する。反応開始後、340nmにおける吸光度を測定して直線的に反応している1分間当たりの吸光度変化A1を求め

る。盲検は酵素液の代わりに酵素溶解希釈用液50 μ Lを加え同様の反応を行い1分間当たりの吸光度変化 A_0 を求める。酵素活性は下記の式より算出する。

【0050】

【数3】

$$U/mL = \frac{(A_1 - A_0)}{6.22} \times \frac{3.05}{0.05} \times B$$

式中の数値は、次の意味である。

6.22 ; NADPHの340nmにおけるミリモル分子吸光係数

3.05 ; 反応総液量(mL)

0.05 ; 反応に供した酵素試料液量(mL)

B ; 酵素液の希釈倍率

ヘキソキナーゼの量は1~1000u/mL、特に1~100u/mLが好ましく、ADP依存性ヘキソキナーゼの量は1~1000u/mL、特に1~100u/mLが好ましいが、その量は被検体の種類や量などにより適宜選択することができ、これ以外の量を用いることもできる。

【0051】

また幅広い濃度範囲の尿中ミオイノシトールを再現性良く測定するためには効率良く酵素サイクリング反応を行わせる必要がある。本発明者らは、酵素サイクリング反応に用いる2種類の補酵素であるチオNAD、NADHの濃度、比率を鋭意検討した結果、チオNAD濃度は終濃度で0.01mM以上に、特に2~10mMに、NADH/チオNAD比は0.01~0.5、特に0.01~0.1にすることが好ましいことが分かった。しかし、その量は被検体の種類や量などにより適宜選択することができ、これ以外の量を用いることもできる。

【0052】

【発明の実施の形態】

本発明の実施例および参考例を詳細に述べるが、本発明は何らこれにより限定されるものではない。

【参考例 1】（チオNAD量の検討）

1) 試薬

< R - 1 >

5mM MES(2-Morpholinoethanesulfonic acid) (pH 6.0)

0~40mM チオNAD (オリエンタル酵母社製)

< R - 2 ; ミオイノシトール定量試薬 >

200mM Bicine (pH 9.0)

0.3mM NADH (オリエンタル酵母社製)

25u/mL ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ (旭化成社製)

2) 方法

測定装置は自動分析装置 7 1 7 0 S (日立化成) を用いた。あらかじめ調製した 0~3000 μ M ミオイノシトール溶液 3 μ L に R - 1 試薬 180 μ L を添加し 37°C 4.8 分間の反応後、R - 2 試薬 180 μ L を加え反応を開始した。反応開始後 5.4 分と 7.8 分の 405nm における吸光度を読みとりその差をとり、1 分間当たりの吸光度増加速度 (Δ mABS/min) を求め、標準液に対する感度を調べた。

3) 結果

結果を図 1 に示す。図 1 に示すように終濃度 0.1~10mM のいずれのチオNAD濃度においてもミオイノシトール 0~3000 μ M で検量線の直線性が認められた。またミオイノシトールの検出感度を上げるためには終濃度 2~10mM のチオNAD濃度が好ましいことが分かった。

【 0 0 5 3 】

【参考例 2】（ミオイノシトール定量試薬のバッファー種の検討）

1) 試薬

< R - 1 >

5mM MES (pH 6.0)

5mM チオNAD (オリエンタル酵母社製)

< R - 2 ; ミオイノシトール定量試薬 >

100mM Buffer (pH 8.8)

0.5mM NADH (オリエンタル酵母社製)

10u/mL ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ（旭化成社製）

2) 方法

R-2 ; ミオイノシトール定量試薬のBufferの種類として、Tris((Tris(hydroxymethyl)aminomethane)、Tricine(N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycine)、Bicine(N,N-Bis(hydroxyethyl)glycine)、TAPS(N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid)、TEA(Triethanolamine)、CHES(2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid)、AMPSO(3-((1,1-Dimethyl-2-hydroxy-ethyl)amino)-2-hydroxypropanesulfonic acid)を選択し、上記の組成で各R-2試薬を調製した。測定装置は自動分析装置7170S（日立化成）を用いた。あらかじめ調製した標準液100 μ M ミオイノシトール溶液15 μ LにR-1試薬180 μ Lを添加し37℃4.8分間の反応後、R-2試薬60 μ Lを加え反応を開始した。反応開始後5.4分と7.8分の405nmにおける吸光度を読みとりその差をとり、1分間当たりの吸光度増加速度 (Δ mABS/min) を求め、標準液に対する感度を調べた。加速試験としてR-2試薬のみを30℃のインキュベーター中にて20日間保存し、7、12、20日目に同様の試験を行い、各R-2試薬の安定性を調べた。

3) 結果

結果を図2に示す。標準液に対する感度が安定であった緩衝液はTris、Tricine、Bicine、TEAであり、最も感度が安定であった緩衝液はBicineであった。

【0054】

【参考例3】（ADP-ヘキソキナーゼの検討）

1) 試薬

<R-1>

5mM MES (pH 6.0)

5mM MgCl₂ (和光純薬工業社製)

8mM ATP (オリエンタル酵母社製)

10mM チオNAD (オリエンタル酵母社製)

10u/mL ATP-ヘキソキナーゼ (旭化成社製)

0~4u/mL ADP-ヘキソキナーゼ (旭化成社製)

<R-2 ; ミオイノシトール定量試薬>

200mM Bicine (pH 9.0)

0.3mM NADH (オリエンタル酵母社製)

25u/mL ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ (旭化成社製)

2) 方法

測定装置は自動分析装置 7 1 7 0 S (日立化成) を用いた。2000 μ M ミオイノシトール溶液 100 μ L と 0~10g/dL グルコース溶液 1mL を混和したものを試料とした。各試料 3 μ L に R-1 試薬 180 μ L を添加し 37℃ 4.8 分間の反応後、R-2 試薬 180 μ L を加え反応を開始した。反応開始後 5.4 分と 7.8 分の 405nm における吸光度を読みとりその差をとり、1 分間当たりの吸光度増加速度 (Δ mABS/min) を求め、各試料に対する感度を調べた。

3) 結果

結果を図 3 に示す。ATP-ヘキソキナーゼと ADP-ヘキソキナーゼを同時に反応させることで、試料中の糖の影響が小さくなり、より正確にミオイノシトールを測定できた。

【 0 0 5 5 】

【参考例 4】 (酵素を用いた高感度なミオイノシトールの定量)

1) 試薬

ミオイノシトール測定試薬

< R-1 ; グルコース消去試薬 >

5mM MES (pH 6.0)

0.05% NaN_3 (和光純薬工業社製)

0.05% OP-10 (日本ケミカルズ社製)

5mM MgCl_2 (和光純薬工業社製)

8mM ATP (オリエンタル酵母社製)

10mM チオ NAD (オリエンタル酵母社製)

10u/mL ATP-ヘキソキナーゼ (旭化成社製)

4u/mL ADP-ヘキソキナーゼ (旭化成社製)

< R-2 ; ミオイノシトール定量試薬 >

200mM Bicine (pH 9.0)

0.05% NaN_3 (和光純薬工業社製)

40mM KHCO_3 (和光純薬工業社製)

0.3mM NADH (オリエンタル酵母社製)

25u/mL ミオイノシトールデヒドロゲナーゼ (旭化成社製)

2) 方法

測定装置は自動分析装置 7 1 7 0 S (日立化成) を用いた。あらかじめ調製したミオイノシトール溶液 3 μL にグルコース消去試薬 180 μL を添加し 37°C 4.8 分間のグルコース消去反応後、ミオイノシトール定量試薬 180 μL を加え反応を開始した。反応開始後 5.4 分と 7.8 分の 405nm における吸光度を読みとりその差をとり、1 分間当たりの吸光度増加速度 ($\Delta\text{mABS}/\text{min}$) を求めた。

3) 結果

結果を図 4 に示す。図 4 に示すように本測定試薬によりミオイノシトールを簡便に定量することができた。ミオイノシトールの測定範囲は 0~2000 μM であり、0mM ミオイノシトールの多重測定により得られた $\Delta\text{mABS}/\text{min}$ の平均 + 2 \times 標準偏差と重ならない最低濃度を最小検出感度とすると、最小検出感度は 10 μM であった。

【 0 0 5 6 】

【実施例 1】 (尿中ミオイノシトール測定による軽症耐糖能異常の判定)

1) 対象

被験者 1 1 2 名に通常の 75g 経口糖負荷試験を施行し、糖負荷直前、糖負荷後 30 分、60 分、120 分、180 分に採血し、血糖、インスリンを測定した。また同時に糖負荷直前、糖負荷後 60 分、120 分、180 分に採尿しミオイノシトール、尿糖、クレアチニンを測定した。

2) 試薬と測定法

血糖：電極法 (京都第一化学：GA-1160)

インスリン：RIA 2 抗体法

ミオイノシトール測定試薬：実施例 4 に同じ。

尿糖：電極法 (京都第一化学：GA-1160)

クレアチニン：クレアチニン-HA テストワコー (和光純薬工業社製)

3) 方法

耐糖能の指標として、75g経口糖負荷直前、糖負荷後30分、60分、120分の血糖値の総和である ΣPG を用いた。75g経口糖負荷直前、糖負荷後60分、120分の各尿中のミオイノシトール濃度、クレアチニン濃度を測定し、尿中クレアチニン排泄量に対するミオイノシトール量（ミオイノシトール／クレアチニン）を求めた。また、糖負荷前後のミオイノシトール量の指標としては、 Δ ミオイノシトール量： $[(60分ミオイノシトール量-負荷前ミオイノシトール量)/2] + [(120分ミオイノシトール量-負荷前ミオイノシトール量)/2]$ を用いた。 ΣPG と Δ ミオイノシトール量の関係を調べた。

4) 結果

結果を表3および図5に示す。図5に示したように、 ΣPG と Δ ミオイノシトール量は非常に良く相関した。 ΣPG が高いことは、糖負荷後の血糖推移が高く維持されていることを示し、すなわち耐糖能異常があることを意味する。また例えば Δ ミオイノシトールの特徴的な値を $10 \mu g/mg$ Cre（クレアチニン）とすれば ΣPG が $530mg/dL$ 程度の軽症耐糖能異常から効率よく検出することができる。

【0057】

【表 3】

	血糖(mg/dL)				インスリン(μ U/mL)				尿中インスリン(μ g/mg Cre)				尿糖(g/dL)				インスリン 分泌インスリン	Σ PG	Δ IRV/ Δ PG
	0分	30分	60分	120分	180分	0分	30分	60分	120分	180分	0分	30分	60分	120分	180分	0分	30分		
1 正常型	89	150	161	135	94	535	5	23	23	22	13	0.30	0.03	0.02	0.02	0.01	15	536	0.30
2 正常型	105	160	153	85	107	483	6	59	40	24	22	0.88	0.02	0.01	0.01	0.01	9	483	0.98
3 正常型	102	119	158	121	78	500	2	28	47	20	11	1.41	0.01	0.02	0.02	0.02	1	500	1.41
4 正常型	85	170	143	98	85	498	5	41	78	21	14	0.42	0.01	0.02	0.01	0.01	9	498	0.42
5 正常型	108	164	162	115	83	547	5	17	19	20	8	0.21	0.02	0.03	0.03	0.02	3	547	0.21
6 正常型	88	125	139	134	125	494	5	10	24	25	16	0.21	0.01	0.01	0.01	0.01	23	494	0.17
7 正常型	92	130	139	90	78	451	5	16	13	19	11	0.29	0.01	0.02	0.02	0.01	7	451	0.29
8 正常型	101	144	135	108	107	488	7	37	27	38	34	0.70	0.02	0.03	0.03	0.03	-4	488	0.70
9 正常型	87	161	172	109	60	529	3	25	21	17	4	0.30	0.01	0.01	0.01	0.01	18	529	0.30
10 正常型	108	175	167	133	60	581	13	83	124	107	14	1.01	0.02	0.03	0.03	0.01	14	581	1.01
11 正常型	106	158	129	128	72	521	12	63	50	73	11	0.98	0.01	0.01	0.01	0.01	6	521	0.98
12 正常型	101	137	101	83	82	422	11	87	86	25	10	2.11	0.01	0.01	0.01	0.01	7	422	2.11
13 正常型	98	129	81	101	97	409	7	49	10	18	11	1.35	0.01	0.01	0.01	0.01	8	409	1.35
14 正常型	92	127	123	85	70	427	9	39	25	18	8	0.88	0.01	0.01	0.01	0.01	0	427	0.88
15 正常型	95	132	103	102	69	432	8	39	30	28	12	0.84	0.01	0.01	0.01	0.01	3	432	0.84
16 正常型	108	167	107	102	85	482	10	75	32	21	9	1.07	0.01	0.03	0.03	0.02	2	482	1.07
17 正常型	88	121	138	100	79	447	6	18	32	15	5	0.38	0.01	0.01	0.01	0.01	4	447	0.38
18 正常型	97	130	88	103	102	418	5	28	18	14	8	0.70	0.01	0.01	0.01	0.01	-2	418	0.70
19 正常型	99	151	114	105	108	469	7	7	8	24	16	0.00	0.02	0.02	0.02	0	3	469	0.00
20 正常型	102	148	176	127	89	553	6	62	59	38	20	1.17	0.01	0.01	0.01	0.01	40	553	1.17
21 正常型	89	108	120	92	102	409	10	51	65	21	37	2.16	0.01	0.01	0.01	0.01	2	409	2.16
22 正常型	91	144	153	105	72	493	9	75	87	38	7	1.25	0.01	0.03	0.02	0.01	-2	493	1.25
23 正常型	101	154	148	91	73	494	5	28	38	14	5	0.40	0.02	0.02	0.02	0.01	1	494	0.40
24 正常型	96	148	177	124	52	545	10	28	59	67	10	0.37	0.01	0.01	0.01	0.01	0	545	0.37
25 正常型	95	168	98	84	76	445	6	78	20	16	4	0.89	0.01	0.02	0.01	0	8	445	0.89
26 正常型	89	147	93	84	55	413	5	26	23	21	4	0.38	0.01	0.01	0.01	0	5	413	0.38
27 正常型	90	129	93	101	81	413	7	36	14	17	6	0.74	0.01	0.01	0.01	0	-4	413	0.74
28 正常型	75	96	75	84	60	330	3	37	17	13	4	1.82	0.03	0.03	0.02	0.02	2	330	1.82
29 正常型	92	127	87	83	89	389	5	37	25	11	5	0.91	0.03	0.01	0	0.01	0	389	0.91
30 正常型	83	109	107	101	78	400	9	32	27	26	12	0.88	0.01	0.01	0.01	0.01	-4	400	0.88
31 正常型	100	123	71	89	78	383	7	32	33	13	3	1.09	0.01	0.01	0.01	0	5	383	1.09
32 正常型	96	110	75	89	82	370	6	46	20	18	7	2.86	0.01	0.01	0.01	0	2	370	2.86
33 正常型	91	108	82	80	82	361	7	16	17	19	8	0.53	0.02	0.01	0	0	4	361	0.53
34 正常型	91	140	152	89	59	482	3	2	5	7	3	-0.02	0.01	0.01	0.01	0	1	482	-0.02
35 正常型	79	119	120	89	60	407	4	9	5	7	2	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	4	407	0.13
36 正常型	100	151	148	139	100	538	10	41	45	49	27	0.61	0.02	0.03	0.03	0	14	538	0.61
37 正常型	98	119	110	85	63	410	5	38	34	18	5	1.43	0.01	0.01	0	0	5	410	1.43
38 正常型	99	145	149	109	63	502	9	21	31	17	7	0.28	0.01	0.02	0.01	0	15	502	0.28
39 正常型	85	98	101	82	50	368	4	14	8	8	4	0.77	0.01	0.01	0.02	0	0	368	0.77

【表3のつづき】

40	正常型	89	114	87	91	63	381	7	9	10	15	3	0.08	27	35	44	44	12	0.01	0.02	0.01	0	12	381	0.08
41	正常型	95	169	175	109	59	548	11	35	46	29	7	0.32	9	10	9	9	0	0	0.02	0.01	0.01	0	548	0.32
42	正常型	76	78	66	90	84	310	2	7	4	10	5	2.50	8	8	8	8	-1	0.01	0.01	0.02	0.01	0	310	2.50
43	正常型	100	124	92	87	85	403	8	51	29	18	5	1.79	8	7	9	12	1	0.01	0.03	0.01	0	1	403	1.79
44	正常型	85	138	117	91	67	441	7	26	44	27	6	0.44	10	17	23	26	10	0.02	0	0	0	10	441	0.44
45	正常型	89	106	85	82	79	362	6	79	32	16	4	4.29	7	8	9	12	2	0.02	0.01	0.01	0	2	362	4.29
46	正常型	103	182	153	96	80	544	9	33	44	20	5	0.27	18	56	38	28	28	0.02	0.77	0.08	0	28	544	0.27
47	正常型	87	131	123	109	69	450	6	42	36	24	4	0.82	7	10	10	9	3	0.01	0.01	0.01	0.01	3	450	0.82
48	正常型	99	126	104	83	66	412	10	47	9	15	5	1.37	27	18	21	18	-7	0	0.02	0	0.01	-7	412	1.37
49	正常型	86	106	86	85	89	363	3	22	18	17	8	0.95	14	20	19	14	5	0	0	0	0	5	363	0.95
50	正常型	84	131	89	89	80	393	8	40	24	12	10	0.72	10	15	17	16	5	0.03	0	0	0	5	393	0.72
51	正常型	85	118	99	110	83	410	6	17	17	18	9	0.35	13	13	12	11	-1	0.03	0.02	0.02	0	-1	410	0.35
52	正常型	87	122	89	96	88	394	6	27	30	35	13	0.60	11	16	20	24	7	0.02	0.02	0.01	0	7	394	0.60
53	正常型	90	147	112	118	52	465	8	72	53	50	8	1.16	17	16	22	26	2	0	0	0	0	2	465	1.16
54	正常型	92	187	186	133	49	598	3	17	25	27	4	0.15	368	487	623	395	188	0	0.23	0.15	0.03	188	598	0.15
55	正常型	99	148	181	133	137	559	5	19	16	15	13	0.30	4	4	4	3	1	0	0	0.01	0	1	559	0.30
56	正常型	99	160	206	138	88	603	11	30	49	72	18	0.31	7	7	14	10	4	0.03	0.04	0	0	4	603	0.31
57	正常型	107	151	189	115	44	582	6	16	44	38	7	0.23	13	20	42	30	18	0.02	0.03	0.05	0.02	18	582	0.23
58	正常型	105	194	234	110	81	843	5	17	40	23	11	0.13	24	32	72	29	28	0	0.04	0.13	0	28	843	0.13
59	正常型	89	167	187	130	108	573	22	133	142	104	79	1.42	26	34	41	27	12	0.02	0.02	0.01	0	12	573	1.42
60	FG	117	165	154	90	80	528	8	37	108	27	11	0.60	24	46	72	45	35	0.01	0.06	0.06	0	35	528	0.60
61	FG	115	174	206	136	65	631	4	8	19	20	4	0.07	12	33	84	25	46	0.01	0.23	0.55	0	46	631	0.07
62	FG	117	204	220	103	152	844	7	31	37	33	18	0.28	37	113	140	58	90	0.01	0.61	1.04	0.12	90	844	0.28
63	FG	110	185	240	127	120	862	6	15	26	15	14	0.12	17	26	59	29	26	0.02	0.05	0.12	0.03	26	862	0.12
64	FG	111	183	200	83	75	577	4	16	22	12	4	0.17	16	28	48	28	22	0	0.1	0.17	0	22	577	0.17
65	FG	110	153	60	88	82	411	5	44	22	18	15	0.91	13	15	19	19	4	0.01	0.01	0.02	0.01	4	411	0.91
66	FG	117	236	192	101	71	846	24	196	100	48	17	1.45	12	19	19	13	7	0.02	0.03	0.02	0.01	7	846	1.45
67	FG	111	166	167	124	70	568	12	53	55	40	8	0.75	9	22	21	14	13	0.01	0.02	0.03	0	13	568	0.75
68	FG	113	204	229	115	58	661	5	20	47	44	12	0.16	49	111	98	42	54	0.01	0.89	0.53	0.03	54	661	0.16
69	IGT	111	192	237	161	83	701	10	18	26	48	9	0.10	22	67	148	94	85	0.01	0.37	1.31	0.41	85	701	0.10
70	IGT	104	153	130	141	141	528	7	28	24	17	16	0.43	15	22	29	28	10	0.02	0.02	0	0.01	10	528	0.43
71	IGT	113	195	224	170	147	702	7	19	44	48	31	0.15	63	114	185	176	86	0.01	0.67	0.38	0.14	86	702	0.15
72	IGT	98	158	213	143	48	612	5	14	22	33	5	0.15	59	72	149	75	52	0.03	0.19	1.18	0.17	52	612	0.15
73	IGT	95	119	147	142	73	503	5	20	21	29	6	0.63	40	31	36	40	-6	0.01	0.01	0.03	0.01	-6	503	0.63
74	IGT	103	187	217	164	111	671	6	18	30	35	11	0.14	21	55	74	27	44	0.01	0.02	0.01	0.01	44	671	0.14
75	IGT	123	198	232	150	158	701	3	30	60	67	56	0.37	31	88	119	88	72	0.01	0.95	0.53	0.88	72	701	0.37
76	IGT	108	150	182	168	124	618	3	17	22	32	26	0.33	15	14	15	13	0	0.02	0.02	0.02	0.02	0	618	0.33
77	IGT	114	178	204	172	136	668	4	10	13	17	12	0.09	28	47	89	49	39	0.02	0.04	0.13	0.03	39	668	0.09
78	IGT	108	211	214	167	69	700	6	38	50	41	10	0.29	15	66	116	28	76	0.01	0.22	0.43	0.03	76	700	0.29
79	IGT	97	211	256	186	117	760	6	20	28	34	16	0.12	15	29	29	26	15	0.03	0.06	0.05	0.01	15	760	0.12
80	IGT	123	218	244	160	83	745	2	11	13	21	7	0.09	17	73	150	27	95	0.02	1.41	1.54	0.02	95	745	0.09

【表3のつづき】

81	IGT	100	161	204	173	101	638	7	9	12	14	12	0.03	15	15	21	18	3	0.02	0.02	0.03	0.02	3	838	0.03
82	IGT	110	219	240	186	100	755	6	15	21	31	13	0.08	32	117	210	178	131	0.03	3.12	4.13	1.44	131	755	0.08
83	糖尿病型	127	206	250	178	125	761	8	21	25	37	21	0.16	15	14	36	27	11	0.02	0.03	0.14	0.08	11	761	0.16
84	糖尿病型	128	249	279	214	89	870	6	22	25	31	15	0.13	50	119	221	144	120	0.02	1.6	1.33	0.31	120	870	0.13
85	糖尿病型	151	228	263	256	166	898	5	12	13	16	7	0.09	50	152	262	208	157	0.03	0.85	2.33	1.02	157	898	0.09
86	糖尿病型	170	278	326	322	197	1096	5	7	8	11	9	0.02	64	146	232	225	125	0.01	1.33	3.46	2.75	125	1096	0.02
87	糖尿病型	204	281	337	363	286	1185	12	15	19	26	28	0.04	21	63	145	151	83	0.05	3.42	7.25	7.25	83	1185	0.04
88	糖尿病型	112	209	262	237	91	820	4	10	18	15	7	0.06	33	106	195	112	117	0.01	1.17	0.98	0.16	117	820	0.06
89	糖尿病型	129	232	288	225	122	874	4	11	15	10	7	0.07	14	71	170	80	106	0.03	2.82	5.89	1.16	106	874	0.07
90	糖尿病型	106	171	253	243	115	773	4	9	20	32	14	0.08	27	44	135	79	63	0.02	0.99	5.11	1.96	63	773	0.08
91	糖尿病型	110	203	232	201	105	746	6	41	43	46	14	0.38	16	83	112	90	82	0.02	1.57	1.92	1.25	82	746	0.38
92	糖尿病型	139	225	286	326	245	976	4	5	8	10	8	0.01	36	86	191	202	103	0.05	2.71	6.43	6.73	103	976	0.01
93	糖尿病型	116	232	285	232	114	865	7	15	20	31	15	0.07	16	50	155	62	87	0.02	1.09	0.73	0.11	87	865	0.07
94	糖尿病型	132	220	329	318	223	999	30	49	80	105	74	0.22	38	40	244	167	104	0.03	0.12	0.4	0.61	104	999	0.22
95	糖尿病型	102	178	250	250	122	780	2	9	13	36	16	0.09	18	26	148	91	69	0	0.08	3.31	1.16	69	780	0.09
96	糖尿病型	173	239	352	311	201	1075	9	7	23	36	20	-0.03	49	108	238	227	123	0.04	2.21	6.46	4.65	123	1075	-0.03
97	糖尿病型	152	238	224	264	263	876	6	17	14	12	11	0.13	40	62	146	167	64	0.01	0.15	0.18	0.11	64	876	0.13
98	糖尿病型	166	252	306	274	205	998	3	11	17	20	10	0.09	15	71	161	114	100	0.01	1.38	4.5	1.68	100	998	0.09
99	糖尿病型	101	249	373	444	342	1167	3	5	7	6	5	0.01	37	154	290	301	185	0.02	3.44	2.45	2.1	185	1167	0.01
100	糖尿病型	152	239	314	299	162	1004	7	11	33	31	12	0.05	33	56	174	127	83	0.03	0.36	3.29	2.23	83	1004	0.05
101	糖尿病型	141	208	261	189	138	799	3	4	7	11	8	0.01	28	66	154	67	82	0.02	0.12	0.66	0.02	82	799	0.01
102	糖尿病型	136	238	262	225	209	859	7	14	18	20	10	0.07	73	160	268	181	141	0.01	0.92	1.76	0.53	141	859	0.07
103	糖尿病型	101	128	193	206	138	628	6	15	25	58	46	0.33	13	19	46	28	20	0.02	0	0.02	0.02	20	628	0.33
104	糖尿病型	110	198	241	257	151	806	5	24	32	55	31	0.22	45	55	99	118	32	0.01	0.15	1.3	1.61	32	806	0.22
105	糖尿病型	152	253	346	291	158	1042	10	19	44	16	23	0.09	99	183	371	280	178	0.11	3.02	3.32	3.2	178	1042	0.09
106	糖尿病型	129	239	202	130	86	700	5	39	65	24	6	0.31	24	69	67	40	44	0.03	1.76	0.59	0.12	44	700	0.31
107	糖尿病型	112	200	250	283	246	845	6	11	15	29	27	0.06	33	66	157	178	78	0.01	0.42	1.62	2.5	78	845	0.06
108	糖尿病型	111	198	251	254	171	814	5	17	20	32	21	0.14	17	43	180	167	94	0.02	0.48	0.99	0.84	94	814	0.14
109	糖尿病型	137	198	258	232	141	825	5	11	30	21	8	0.10	27	105	177	138	114	0.06	3.88	6.04	3.78	114	825	0.10
110	糖尿病型	134	201	276	233	151	844	5	13	19	20	11	0.12	22	43	138	85	68	0.02	0.65	4.88	2.69	68	844	0.12
111	糖尿病型	111	169	240	201	101	721	4	12	28	28	10	0.14	27	63	132	90	70	0.01	0.43	1.44	0.1	70	721	0.14
112	糖尿病型	136	201	200	137	141	674	7	8	10	20	13	0.02	26	35	38	31	11	0.01	0.01	0	0	11	674	0.02

【0058】

【実施例2】（尿中ミオイノシトール測定によるインスリン初期分泌不良の判定）

1) 対象

実施例5に同じ。

2) 試薬と測定法

実施例5に同じ。

3) 方法

75g経口糖負荷直前、糖負荷後60分、120分の各尿中のミオイノシトール濃度、クレアチニン濃度を測定し、尿中クレアチニン排泄量に対するミオイノシトール量（ミオイノシトール／クレアチニン）を求めた。

また、糖負荷前後のミオイノシトール量の指標としては、 Δ ミオイノシトール量： $[(60\text{分ミオイノシトール量}-\text{負荷前ミオイノシトール量})/2] + [(120\text{分ミオイノシトール量}-\text{負荷前ミオイノシトール量})/2]$ を用いた。

インスリノジェニック・インデックス（I. I.）と Δ ミオイノシトール量の関係を調べた。

4) 結果

結果を図6に示す。図6に示したように、インスリノジェニック・インデックスと Δ ミオイノシトール量には関連が認められ、 Δ ミオイノシトール量が $15\mu\text{g}/\text{mg Cre}$ 以上であればかなり高率にインスリノジェニック・インデックスは0.4未満であった。日本糖尿病学会の指針によれば、インスリノジェニック・インデックス <0.4 であればインスリン初期分泌不良と判断できる。図6から明らかに、 Δ ミオイノシトールの特徴的な値を $15\mu\text{g}/\text{mg Cre}$ とすればインスリノジェニック・インデックスが0.4未満、つまりインスリン初期分泌不良であるものを効率よく検出することができる。

【0059】

【実施例3】（尿中ミオイノシトール測定と尿糖測定による軽症耐糖能異常の判定）

1) 対象

実施例 5 に同じ。

2) 試薬と測定法

実施例 5 に同じ。

3) 方法

75g経口糖負荷直前、糖負荷後60分、120分の各尿中のミオイノシトール濃度、クレアチニン濃度を測定し、尿中クレアチニン排泄量に対するミオイノシトール量（ミオイノシトール／クレアチニン）を求めた。また同時に尿糖濃度を求めた。糖負荷前後のミオイノシトール量の指標としては、 Δ ミオイノシトール量： $[(60\text{分ミオイノシトール量}-\text{負荷前ミオイノシトール量})/2] + [(120\text{分ミオイノシトール量}-\text{負荷前ミオイノシトール量})/2]$ を用いた。

4) 結果

Δ ミオイノシトール量が $10\mu\text{g}/\text{mg Cre}$ 以上である場合をプラス（+）、そうでない場合をマイナス（-）とした。同様に尿糖に関しては糖負荷2時間後の尿糖が $50\text{mg}/\text{dL}$ 以上である場合を+、そうでない場合を-とした。 ΣPG は実施例 5 で算出したものを用いた。

検討した 112 名中、 Δ ミオイノシトール-尿糖一群は 52 名、 Δ ミオイノシトール+尿糖一群は 12 名、 Δ ミオイノシトール+尿糖+群は 48 名であった。 Δ ミオイノシトール-尿糖+群に該当するものは無かった。 Δ ミオイノシトール-尿糖一群、 Δ ミオイノシトール+尿糖一群、 Δ ミオイノシトール+尿糖+群それぞれの ΣPG を比較した。

結果を図7に示す。図7に示すように Δ ミオイノシトール-尿糖一群における ΣPG の平均値、および標準偏差はそれぞれ $453\text{mg}/\text{dL}$ 、 $76.6\text{mg}/\text{dL}$ であった。 Δ ミオイノシトール+尿糖一群における ΣPG の平均値、および標準偏差はそれぞれ $556\text{mg}/\text{dL}$ 、 $81.1\text{mg}/\text{dL}$ であった。 Δ ミオイノシトール+尿糖+群における ΣPG の平均値、および標準偏差はそれぞれ $791\text{mg}/\text{dL}$ 、 $164.8\text{mg}/\text{dL}$ であった。また Δ ミオイノシトール-尿糖一群の ΣPG と比べ、 Δ ミオイノシトール+尿糖一群の ΣPG は有意に高く、 Δ ミオイノシトール+尿糖+群の ΣPG は更に有意に高かった。

このことから尿中ミオイノシトール、尿糖を併せて測定することにより非侵襲

的に耐糖能異常の程度を判定することができた。

【 0 0 6 0 】

【実施例 4】（尿中ミオイノシトール測定と尿糖測定によるインスリン初期分泌不良の判定）

1) 対象

実施例 5 に同じ。

2) 試薬と測定法

実施例 5 に同じ。

3) 方法

実施例 7 に同じ。

4) 結果

△ミオイノシトール量が $10 \mu\text{g}/\text{mg Cre}$ 以上である場合をプラス (+)、そうでない場合をマイナス (-) とした。同様に尿糖に関しては糖負荷 2 時間後の尿糖が $50\text{mg}/\text{dL}$ 以上である場合を +、そうでない場合を - とした。インスリノジェニック・インデックスは実施例 6 で算出したものを用いた。

△ミオイノシトール-尿糖-群、△ミオイノシトール+尿糖-群、△ミオイノシトール+尿糖+群それぞれのインスリノジェニック・インデックス ($\Delta IRI_{30-0}/\Delta PG_{30-0}$) を比較した。

結果を図 8 に示す。図 8 に示すように△ミオイノシトール-尿糖-群における $\Delta IRI_{30-0}/\Delta PG_{30-0}$ の平均値、および標準偏差はそれぞれ 1.32、0.79 であった。△ミオイノシトール+尿糖-群における $\Delta IRI_{30-0}/\Delta PG_{30-0}$ の平均値、および標準偏差はそれぞれ 0.45、0.42 であった。△ミオイノシトール+尿糖+群における $\Delta IRI_{30-0}/\Delta PG_{30-0}$ の平均値、および標準偏差はそれぞれ 0.16、0.19 であった。また△ミオイノシトール-尿糖-群の $\Delta IRI_{30-0}/\Delta PG_{30-0}$ と比べ、△ミオイノシトール+尿糖-群の $\Delta IRI_{30-0}/\Delta PG_{30-0}$ は有意に低く、△ミオイノシトール+尿糖+群の $\Delta IRI_{30-0}/\Delta PG_{30-0}$ は更に有意に低かった。

このことから尿中ミオイノシトール、尿糖を併せて測定することにより非侵襲的にインスリン初期分泌不良の程度を判定することができた。

【0061】

【実施例5】（尿中ミオイノシトール測定による軽症耐糖能異常の判定）

1) 対象

実施例1のうち、空腹時血糖110mg/dl未満かつ負荷後2時間血糖140mg/dl未満である正常型に分類された59名。

2) 試薬と測定法

実施例1に同じ。

3) 方法

正常型と判定された中で、負荷後1時間血糖180mg/dL以上、または負荷後2時間血糖120mg/dL以上のものをやや耐糖能の低下した症例（軽症耐糖能異常）としてB群、それ以外のものをA群とした。正常型と判定された59名中、A群は45名、B群は14名であった。75g経口糖負荷直前、糖負荷後60分、120分の各尿中のミオイノシトール濃度、クレアチニン濃度を測定し、A群、B群の尿中クレアチニン排泄量に対するミオイノシトール量（ミオイノシトール/クレアチニン）を求めた。

また、糖負荷前後のミオイノシトール量の指標としては、 Δ ミオイノシトール量： $[(60\text{分ミオイノシトール量}-\text{負荷前ミオイノシトール量})/2] + [(120\text{分ミオイノシトール量}-\text{負荷前ミオイノシトール量})/2]$ を用いた。

4) 結果

結果を図9に示す。図9に示したように、A群の Δ ミオイノシトール平均値は $3.9 \mu\text{g}/\text{mg Cre}$ 、B群の Δ ミオイノシトール平均値は $25.8 \mu\text{g}/\text{mg Cre}$ であり、A群に比べやや耐糖能の低下したB群（軽症耐糖能異常）では Δ ミオイノシトールが高い結果であった。

【0062】

【実施例6】（尿中ミオイノシトール測定によるインスリン初期分泌不良の判定）

1) 対象

実施例5に同じ。

2) 試薬と測定法

実施例1に同じ。

3) 方法

正常型と判定された中で、インスリノジェニック・インデックスが0.4未満のものをB群、それ以外のものをA群とした。正常型と判定された59名中、A群は37名、B群は22名であった。75g経口糖負荷直前、糖負荷後60分、120分の各尿中のミオイノシトール濃度、クレアチニン濃度を測定し、A群、B群の尿中クレアチニン排泄量に対するミオイノシトール量（ミオイノシトール／クレアチニン）を求めた。

また、糖負荷前後のミオイノシトール量の指標としては、 Δ ミオイノシトール量： $[(60\text{分ミオイノシトール量}-\text{負荷前ミオイノシトール量})/2] + [(120\text{分ミオイノシトール量}-\text{負荷前ミオイノシトール量})/2]$ を用いた。

4) 結果

結果を図10に示す。図10に示したように、A群の Δ ミオイノシトール平均値は $4.4\mu\text{g}/\text{mg Cre}$ 、B群の Δ ミオイノシトール平均値は $16.9\mu\text{g}/\text{mg Cre}$ であり、A群に比べインスリン初期分泌の低下したB群では Δ ミオイノシトールが高い結果であった。

【0063】

【発明の効果】

以上のとおり、本発明によれば、軽症耐糖能異常および／またはインスリン初期分泌不良を非侵襲的に、簡便かつ再現性良く判定する検査方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 参考例1に基づくチオNAD量の検討結果を示す。

【図2】 参考例2に基づくミオイノシトール試薬の安定性試験の結果を示す。

【図3】 参考例3に基づくADP-ヘキソキナーゼの影響を示す。

【図4】 参考例4に基づくミオイノシトール定量曲線を示す。

【図5】 実施例1に基づくミオイノシトールと ΣPG の関連図である。

【図6】 実施例2に基づくイノシトールとインスリノジェニック・インデックスの関連図である。

【図7】 実施例3に基づく各群と ΣPG の関連図である。

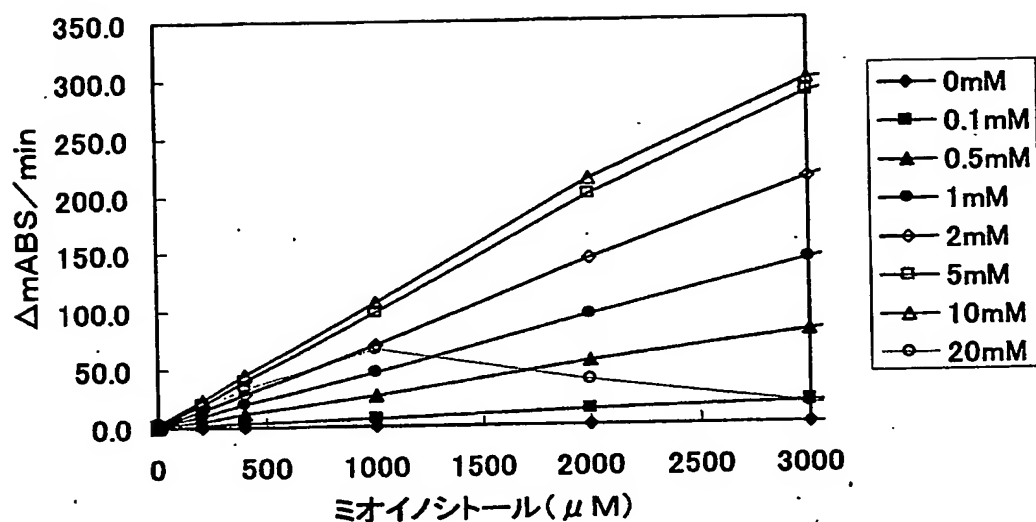
【図 8】 実施例 4 に基づく各群とインスリノジェニック・インデックスの関連図である。

【図 9】 実施例 5 に基づく各群とミオイノシトールとの関連図である。

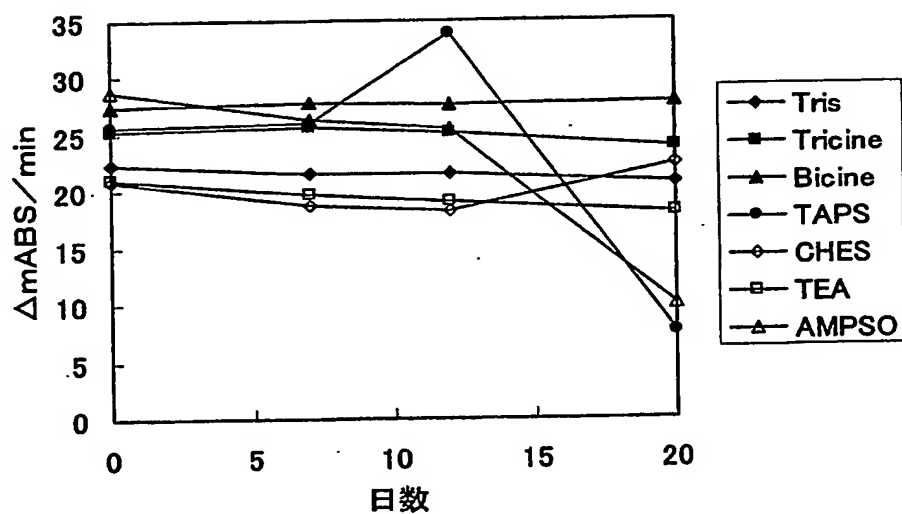
【図 1 0】 実施例 6 に基づく各群とミオイノシトールとの関連図である。

【書類名】 図面

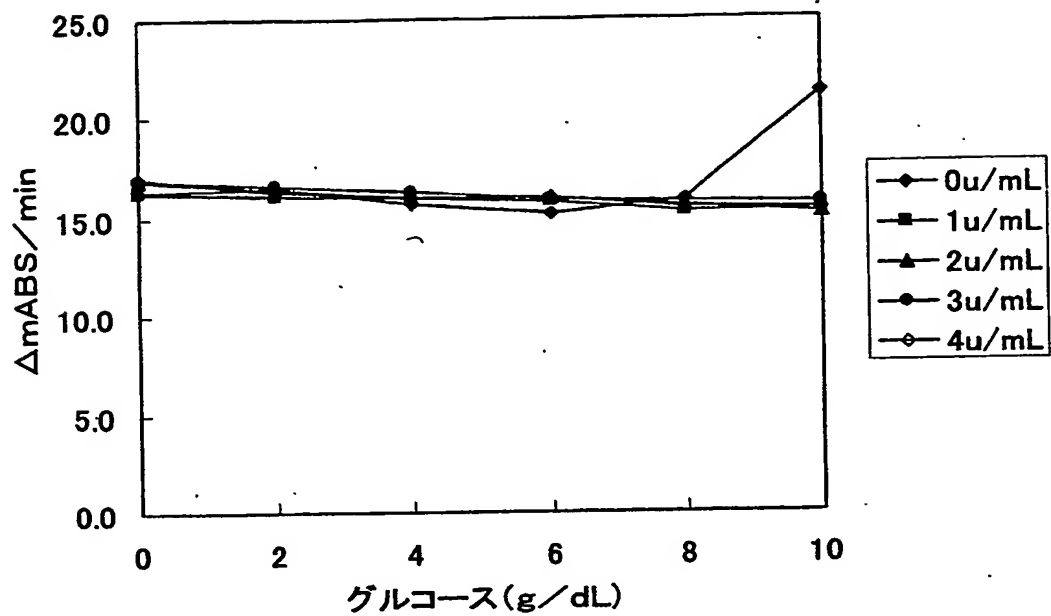
【図 1】



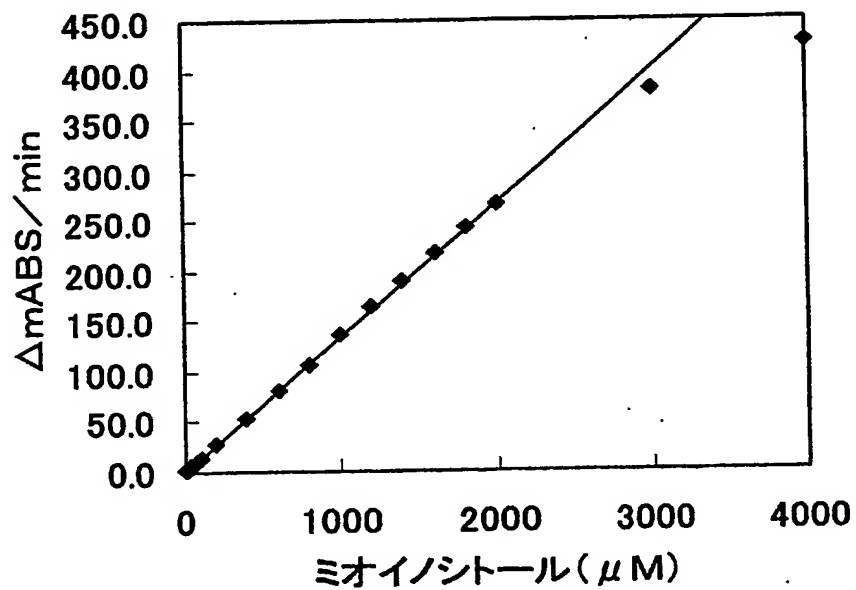
【図 2】



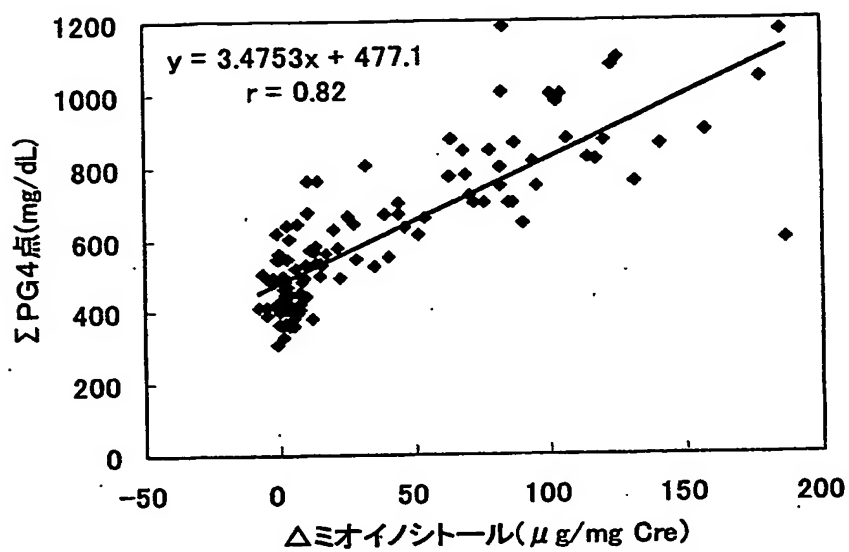
【図 3】



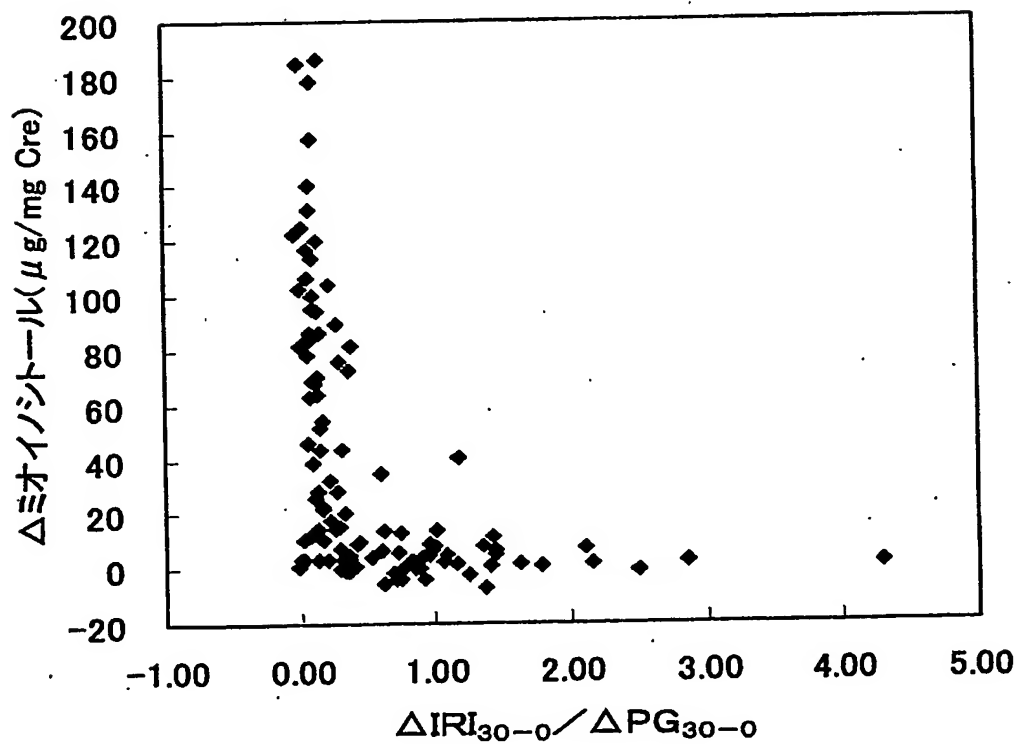
【図 4】



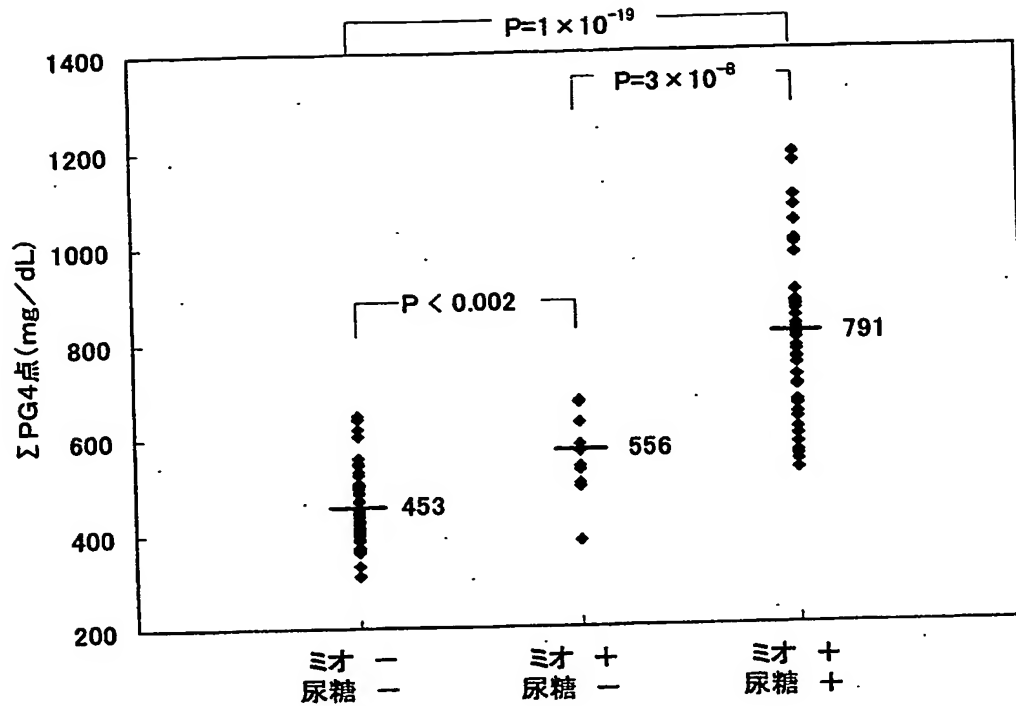
【図 5】



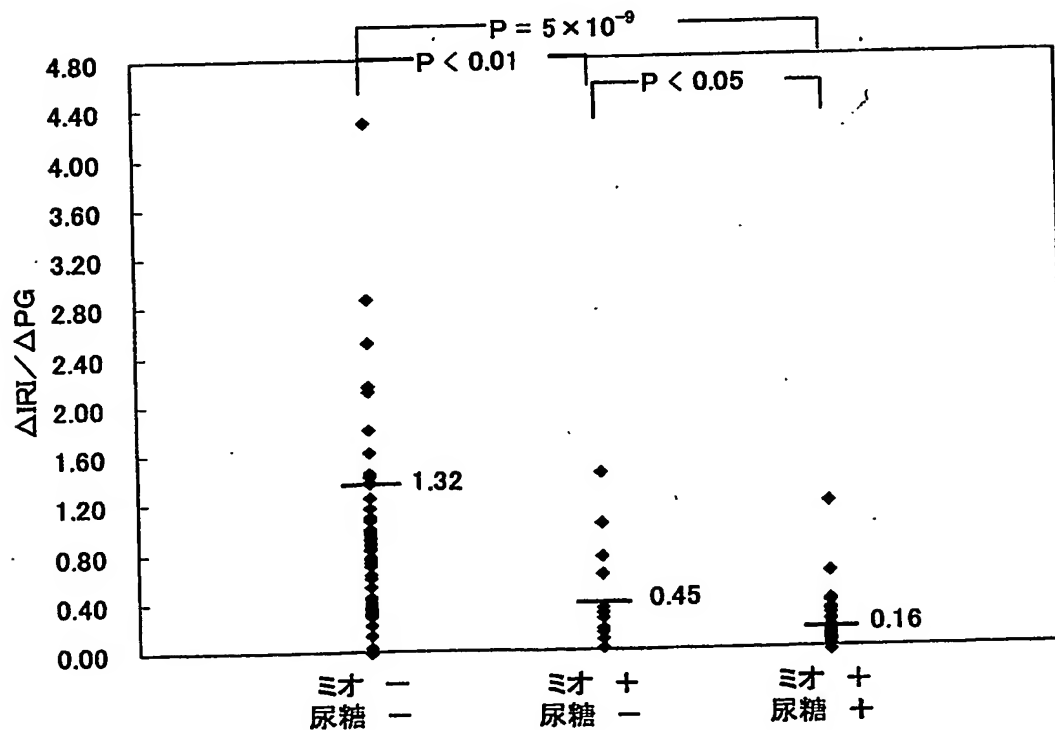
【図 6】



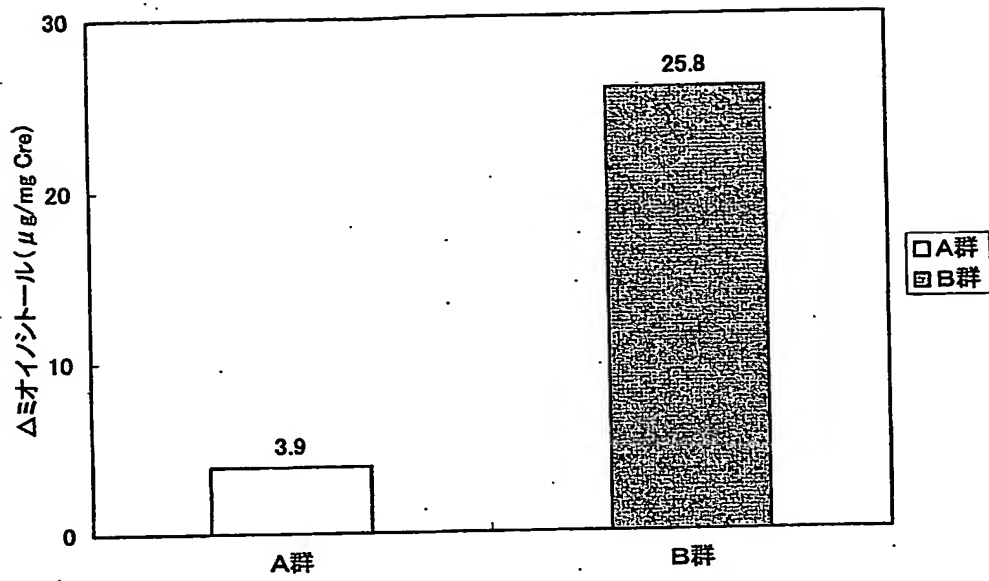
【図 7】



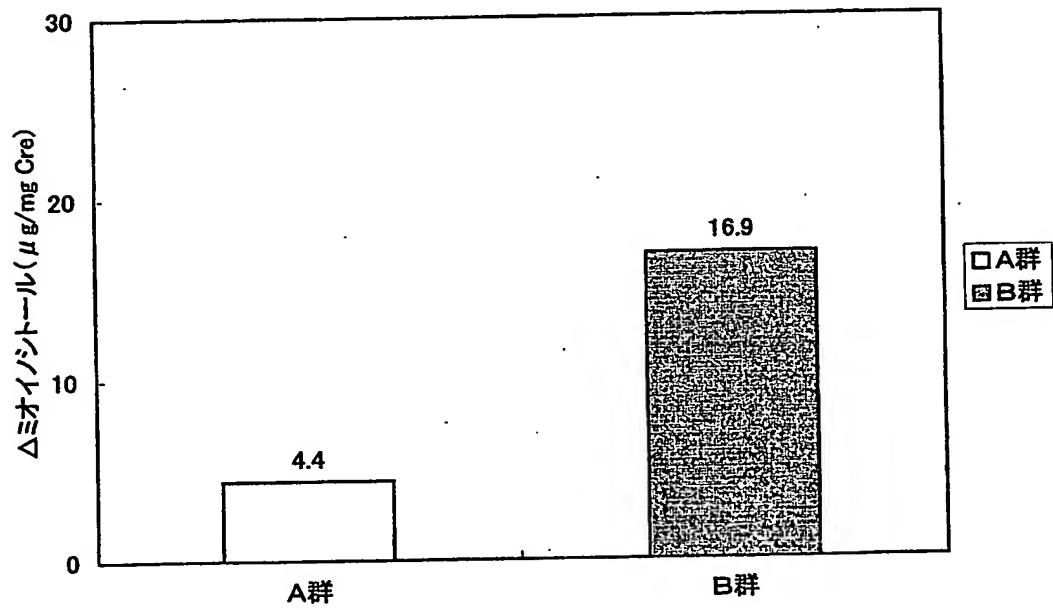
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【課題】 酵素を用いた測定方法によって、非侵襲的に軽症耐糖能異常および／またはインスリン初期分泌不良を簡便に検出する方法を提供する。

【解決手段】 被験者への糖負荷前および糖負荷一定時間後に尿中に排泄されるミオイノシトールの量を本試薬にて測定し、前後のミオイノシトールの増加量、または増加率をあらかじめ健常者にて設定した特徴的な値と比較して軽症耐糖能異常および／またはインスリン初期分泌不良を検出する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2002-097121

受付番号

50200460979

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0094

作成日

平成14年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年 3月29日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号

[000000033]

1. 変更年月日 2001年 1月 4日

[変更理由] 名称変更

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

氏 名 旭化成株式会社